

Cara uji mikrobiologi - Bagian 7: Perhitungan kapang dan khamir pada produk perikanan





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
Pendahuluan.....	iii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	1
4 Peralatan	2
5 Media dan Pereaksi	2
6 Kondisi	2
7 Prosedur	2
8 Perhitungan koloni	3
9 Pelaporan	4
10 Keamanan dan keselamatan	4
Lampiran A (normatif) Pembuatan media.....	5
Lampiran B (normatif) Skema perhitungan kapang dan khamir pada produk perikanan	6
Lampiran C (informatif) Verifikasi perhitungan kapang dan khamir.....	8
Bibliografi	9

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan komoditas produk perikanan yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang metode uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini merupakan revisi dari SNI 2332.7:2009, Cara uji mikrobiologi - Bagian 7: Perhitungan kapang dan khamir pada produk perikanan.

Bagian yang direvisi meliputi prinsip, media dan pereaksi, prosedur meliputi homogenisasi dan pengenceran, metode cawan agar tuang (*pour plate method*), metode cawan agar sebar (*spread plate method*), dan perhitungan.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan, yang telah dirumuskan melalui rapat teknis, dan rapat konsensus pada tanggal 2 - 4 Juli 2015 di Bogor dihadiri oleh wakil dari produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi dan instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 10 Agustus 2015 sampai dengan 9 Oktober 2015 dengan hasil akhir RASNI.



Pendahuluan

Berkaitan dengan penyusunan SNI ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor PER.19/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.



Cara uji mikrobiologi - Bagian 7: Perhitungan kapang dan khamir pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk menentukan jumlah total kapang dan khamir pada produk perikanan.

2 Istilah dan definisi

2.1

aktivitas air (a_w)

rasio antara tekanan uap air pada larutan dengan tekanan uap pada air murni pada suhu dan tekanan yang sama

2.2

inkubasi

pengkondisian pertumbuhan mikroorganisme pada suhu dan waktu yang optimum

2.3

kapang

mikroorganisme terdiri lebih dari satu sel berupa benang-benang halus yang disebut hifa, kumpulan hifa disebut miselium, berkembang biak dengan spora

2.4

khamir

mikroorganisme bersel tunggal berbentuk bulat lonjong dan berkembang biak melalui pembentukan tunas atau askospora, tetapi tidak membentuk miselium

2.5

koloni

kumpulan sel mikroorganisme yang tumbuh pada media agar dan dapat dilihat secara visual

2.6

mikroorganisme

kelompok organisme yang berukuran kecil dan hanya dapat dilihat dibawah mikroskop

2.7

media agar

media padat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme

2.7

produk perikanan

setiap bentuk produk pangan berupa ikan utuh atau produk yang mengandung bagian ikan, termasuk produk yang sudah diolah dengan cara apapun yang berbahan baku utama ikan

3 Prinsip

Pertumbuhan kapang dan khamir setelah contoh diinkubasikan dalam media agar pada suhu 25 °C selama 5 hari. Penentuan jumlah kapang dan khamir dapat dilakukan dengan dua cara yaitu metode cawan agar tuang (*pour plate*) dan atau cawan agar sebar (*spread plate*).

4 Peralatan

- a) Alat penghitung koloni
- b) *Autoclave*
- c) Batang gelas bengkok diameter 3 mm – 4 mm, dengan panjang tangkai 15 cm – 20 cm
- d) Botol pengencer 20 mL
- e) Cawan Petri 15 mm x 90 mm
- f) Erlenmeyer
- g) Inkubator suhu 25 °C
- h) Pipet: 0,1 mL, 1 mL, 5 mL dan 10 mL
- i) *Stomacher*
- j) Timbangan dengan ketelitian 0,01 g

5 Media dan Pereaksi

- a) *Dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) agar*
- b) *Dichloran 18% glycerol (DG18) agar*
- c) Larutan 0,1% *peptone water*

CATATAN Media agar DRBC hanya digunakan untuk metode cawan agar sebar (*spread plate*), sedangkan media agar DG18 disarankan untuk metode cawan agar tuang (*pour plate*). Sampel dengan aktivitas air (a_w) kurang dari 0,95 disarankan menggunakan media DG18 baik menggunakan metode cawan agar sebar (*spread plate*) maupun metode cawan agar tuang (*pour plate*).

6 Kondisi

Suhu media agar yang akan dituang adalah 45 ± 1 °C.

7 Prosedur

7.1 Preparasi contoh

Contoh yang akan diuji diambil secara aseptik dan acak dengan ketentuan berat sebagai berikut:

- a) Contoh dengan berat kurang dari 1 kg, diambil sebanyak 100 g.
- b) Contoh dengan berat 1 kg – 4,5 kg, diambil sebanyak 300 g.
- c) Contoh dengan berat lebih dari 4,5 kg, diambil sebanyak 500 g.

7.2 Homogenisasi dan pengenceran

- a) Timbang contoh secara aseptik sebanyak 25 g untuk contoh (a) dan (b) dan 50 g untuk contoh (c) diatas, kemudian masukan dalam wadah steril atau plastik steril;
- b) tambahkan larutan 0,1% *peptone water* sebanyak 225 mL untuk contoh 25 g dan 450 mL untuk contoh 50 g, homogenkan selama 2 menit. Homogenate ini merupakan larutan pengenceran 10^{-1} ;
- c) ambil 1 mL homogenat diatas menggunakan pipet steril, dan masukkan ke dalam 9 mL larutan 0,1% *peptone water* untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} ;
- d) siapkan pengenceran selanjutnya (10^{-3}) dengan mengambil 1 mL contoh dari pengenceran 10^{-2} ke dalam 9 mL larutan 0,1% *peptone water*;
- e) lakukan pengenceran sesuai kebutuhan atau pengenceran maksimum sampai 10^{-6} .

7.3 Metode cawan agar tuang (*pour plate method*)

- Pipet 1 mL dari setiap pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dst dan masukkan ke dalam cawan Petri steril. Lakukan secara triplo untuk setiap pengenceran;
- setelah contoh dimasukkan, tambahkan 20 mL – 25 mL media agar DG18 yang sudah didinginkan dalam *waterbath* hingga mencapai suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ dalam waktu 1 - 2 menit ke dalam masing-masing cawan yang sudah berisi contoh. Supaya contoh dan media agar DG18 tercampur sempurna, lakukan pemutaran cawan ke depan ke belakang ke kiri dan ke kanan;
- setelah agar memadat, masing-masing cawan tersebut diinkubasikan dalam posisi tidak terbalik dan disusun tidak lebih dari 3 cawan Petri dalam inkubator pada suhu $25 ^\circ\text{C}$ selama 5 hari;
- lakukan kontrol tanpa contoh dengan mencampur larutan pengencer dengan media agar DG18;
- dari penyiapan pengenceran pertama sampai menuang agar dilakukan tidak lebih dari 20 menit.

7.4 Metode cawan agar sebar (*spread plate method*)

- Tuang 20 mL – 25 mL media agar DRBC ke dalam cawan-cawan Petri steril dan dinginkan sampai memadat;
- pipet 0,1 mL contoh dari masing-masing pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} , dst) ke dalam cawan Petri yang telah berisi media agar DRBC dan ratakan dengan menggunakan batang gelas bengkok. Lakukan secara triplo untuk semua pengenceran;
- lakukan kontrol tanpa contoh dengan mencampur larutan pengencer dengan media agar DRBC;
- dari penyiapan pengenceran pertama sampai menyebar contoh pada media agar dilakukan tidak lebih dari 20 menit;
- cawan-cawan tersebut diinkubasi dalam kondisi gelap dan posisi tidak terbalik dan disusun tidak lebih dari 3 cawan Petri dalam inkubator pada suhu $25 ^\circ\text{C}$ selama 5 hari.

CATATAN Untuk pengujian kapang dan khamir lebih direkomendasikan menggunakan metode cawan agar sebar.

8 Perhitungan koloni

8.1 Cawan yang mengandung jumlah 10 - 150 koloni

Hitung cawan setelah masa inkubasi 5 hari, jika setelah 5 hari tidak ada pertumbuhan, inkubasi kembali selama 48 jam. Jangan menghitung koloni sebelum masa inkubasi berakhir karena perlakuan tersebut dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder dari spora yang terlepas sehingga jumlah akhir tidak valid. Laporkan hasil sebagai koloni/g berdasarkan rata-rata 3 cawan (triplo) x tingkat pengenceran.

8.2 Jika semua pengenceran tidak ditemukan koloni

Laporkan hasil: < 1 x tingkat pengenceran.

CATATAN untuk metode agar cawan sebar (*spread plate*), perhitungan jumlah koloni adalah hasil rata-rata 3 cawan (triplo) dikalikan 10 x tingkat pengenceran.

9 Pelaporan

- Untuk menghasilkan perhitungan yang akurat dan teliti maka laporkan hasilnya dengan dua angka (digit) pertama sebagai hasil pembulatan.
- Bulatkan keatas dengan cara menaikkan angka kedua menjadi angka yang lebih tinggi bila angka ketiga adalah 6,7,8 atau 9 dan gunakan 0 untuk masing-masing angka pada digit berikutnya.
- Bulatkan ke bawah bila angka ketiga adalah 1, 2, 3 atau 4.
- Bila angka ketiga 5, bulatkan keatas bila angka kedua ganjil dan bulatkan kebawah bila angka kedua genap.

CONTOH:

Hasil perhitungan	Angka kapang dan khamir
12.700	13.000
12.400	12.000
15.500	16.000
14.500	14.000

10 Keamanan dan keselamatan

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- a) Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisis.
- b) Gunakan jas laboratorium, sarung tangan dan masker selama melakukan analisis.
- c) Lakukan setiap tahapan analisa secara aseptis.
- d) Bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan analisis.
- e) Bersihkan segera contoh yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan.
- f) Media yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dibuang.

Lampiran A
(normatif)
Pembuatan media

A.1 Dichloran 18% glycerol (DG18) agar

Glucose	10.0 g
Peptone	5.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilin), larutan (0.2% (w/v) dalam etanol)	1 mL
Chloramphenicol	0.1 g
Agar	15.0 g
Akuades	800 mL

Campurkan seluruh bahan dan panaskan untuk melarutkan agar, tambahkan akuades sampai 1000 mL. Tambahkan 220 g glycerol dan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Aktivitas air (a_w) akhir media DG18 agar adalah 0.955.

A.2 Dichloran rose Bengal chloramphenicol (DRBC) agar

Glucose	10.0 g
Bacteriological peptone	5.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Rose Bengal (5% dalam pelarut air (w/v))	1 mL
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilin), larutan (0.2% (w/v) dalam etanol)	1 mL
Chloramphenicol	0.1 g
Agar	15.0 g
Akuades	1 L

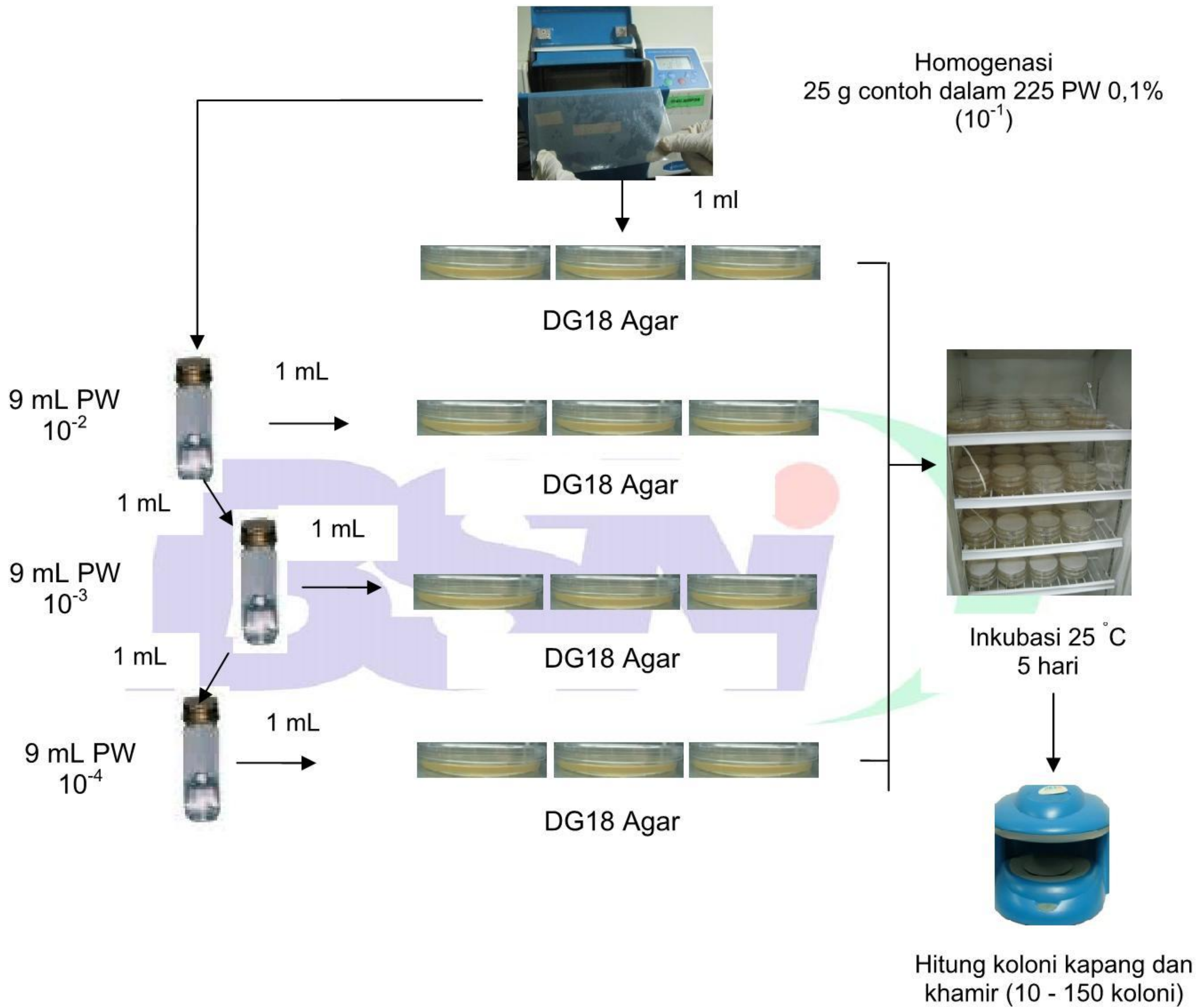
pH akhir harus 5.6

Campur seluruh bahan, panaskan sampai agar larut dan sterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Turunkan suhu sampai 45 ± 1 °C dalam *waterbath* untuk kemudian dituang.

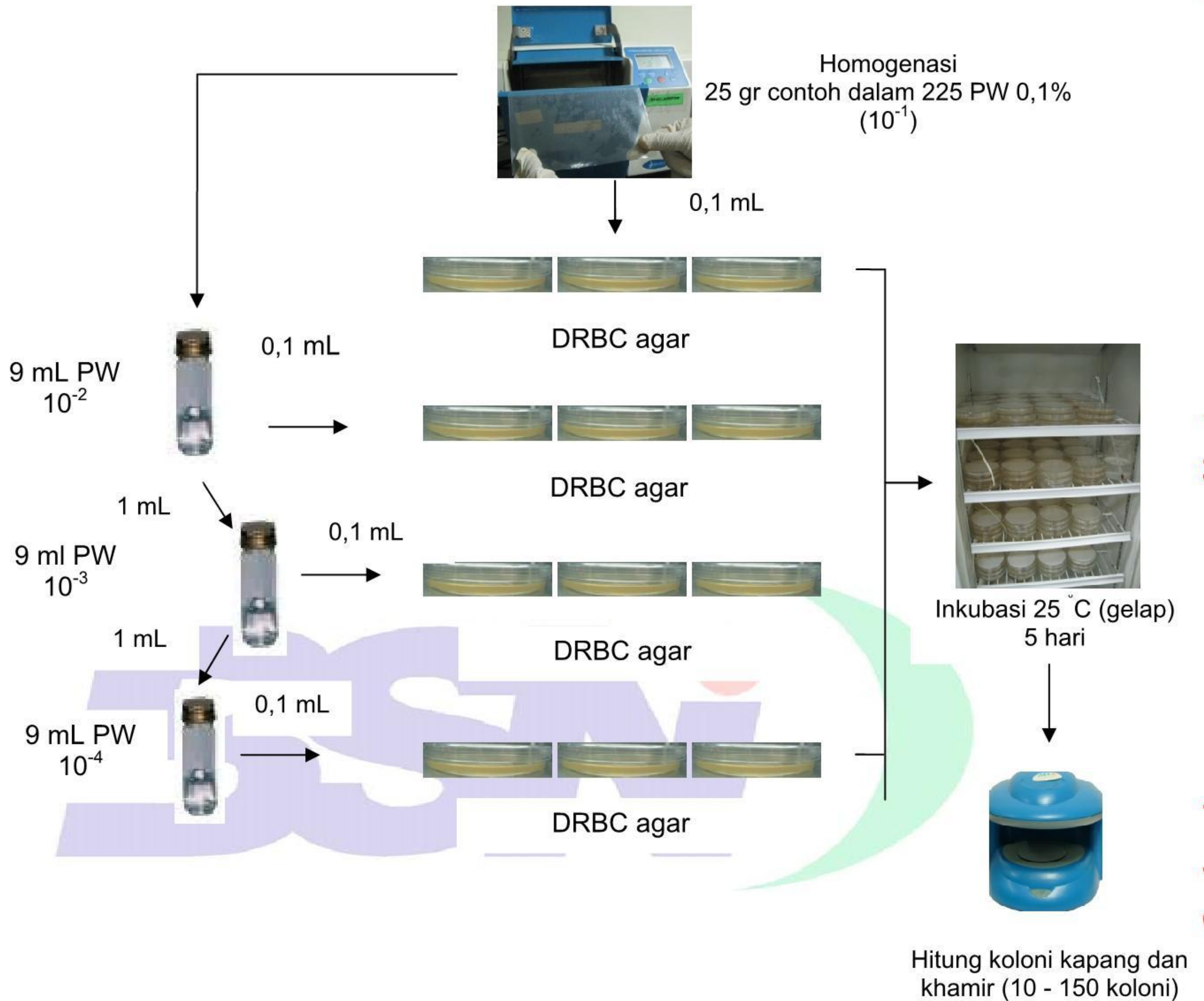
Media DRBC mengandung rose bengal yang sensitif terhadap cahaya, paparan cahaya relatif singkat akan mengakibatkan pembentukan senyawa penghambat. Simpan media dalam kondisi gelap dan dingin sampai digunakan.

Lampiran B
(normatif)
Skema perhitungan kapang dan khamir pada produk perikanan

B.1 Metode cawan agar sebar (*pour plate*)



B.2 Metode cawan agar sebar (*spread plate*)



Lampiran C
(informatif)
Verifikasi perhitungan kapang dan khamir

Relatif Standar Deviasi (RSD)

Uji verifikasi dilakukan secara kuantitatif dengan parameter RSD. Verifikasi dilakukan pada produk perikanan ikan asin, dodol rumput laut dan bandeng presto dengan jumlah sampel masing-masing matriks 16. Nilai RSD untuk matriks ikan asin 0,019; dodol rumput laut 0,049; dan bandeng presto 0,018.



Bibliografi

Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. April 2001 edition. Chapter 18. AOAC International

Laporan Verifikasi Pengujian Kapang dan Khamir pada Produk Perikanan. Balai Besar Pengujian Penerapan Hasil Perikanan Tahun 2013.

